ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ПО ГЕНУ УРОКИНАЗЫ НА УРОВЕНЬ TNF-А И ЕГО РЕЦЕПТОРОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ, РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ НЕЙРОГЕННОЙ БОЛИ

Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Бандовкина В. А.,
Сурикова Е. И., Черярина Н. Д., Нескубина И. В.,
Трепитаки Л. К., Лесовая Н. С.

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Ростов-на-Дону, Россия

Контактная информация:

Каплиева Ирина Викторовна,
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава
России,
14-я линия, д. 63, Ростов-на-Дону, Россия,
344037.
E-mail: kaplirina@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 30.06.2020
и принята к печати 21.07.2020.

Резюме

Актуальность. Несмотря на функциональную множественность и сложность действий TNF- α , его роль в центральной нервной системе при развитии различных патологических состояний в организме до сих пор не понята. **Цель.** Изучить динамику TNF- α и его рецепторов в головном мозге мышей с нокаутом по урокиназе (uPA-) при злокачественном росте на фоне хронической нейрогенной боли (ХНБ). **Материалы и методы.** Работа выполнена на мышах обоего пола двух линий: C57BL/6 (n = 80) и C57BL/6-Plautm1.IBug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (n = 56). В основных группах животных ХНБ моделировали путем двусторонней перевязки седалищных нервов, через 2 недели под кожу спины перевивали меланому B16/F10. Группа сравнения — ложно оперированные животные с перевивной меланомой. Контрольные группы — ложно оперированные животные и животные с ХНБ. На 21 сутки роста меланомы мышей декапировали, в церебральной ткани методом иммуноферментного анализа определяли содержание TNF- α , sTNF- α R1 и sTNF- α R2. **Результаты.** В мозге самцов uPA- регистрировался высокий уровень TNF- α (в 5,6 раза) и низкий — TNF- α R1 (в 2,1 раза), у самок — изменений не было. Под влиянием ХНБ содержание TNF- α в мозге становилось одинаковым у самцов и самок мышей, при этом у мышей uPA- уровень TNF- α был более чем в 2,0 раза больше, чем у мышей с нормальным геномом. Основу стимулирующего действия ХНБ на злокачественный процесс у мышей uPA- составили: у самок — увеличение церебральной концентрации TNF- α R2 (в 1,7 раза; $p < 0,05$), у самцов — редукция TNF- α (в 2,2 раза). **Заключение.** Специфика фибринолитического статуса мышей определяет течение злокачественного процесса подкожно перевитой меланомы на фоне боли, один из механизмов этого явления — изменение функционирования системы TNF- α головного мозга, зависящее от пола животного.

Ключевые слова: TNF- α , головной мозг, меланома, мыши, нокаут по урокиназе, хроническая боль.

Для цитирования: Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Бандовкина В.А. и др. Влияние нокаута по гену урокиназы на уровень TNF- α и его рецепторов в головном мозге мышей при экспериментальной меланоме, развивающейся на фоне хронической нейрогенной боли. Трансляционная медицина. 2020;7(4):74-82. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-4-74-82

INFLUENCE OF UROKINASE GENE KNOCKOUT ON LEVELS OF TNF- α AND ITS RECEPTORS IN THE BRAIN OF MICE WITH EXPERIMENTAL MELANOMA DEVELOPING IN PRESENCE OF CHRONIC NEUROGENIC PAIN

Frantsiyants E. M., Kaplieva I. V., Bandovkina V. A., Surikova E. I., Cheryarina N. D., Neskubina I. V., Trepitaki L. K., Lesovaya N. S.

National Medical Research Centre of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Corresponding author:

Kaplieva Irina V.,
National Medical Research Centre of
Oncology,
14 line, 63, Rostov-on-Don, Russia, 344037.
E-mail: kaplirina@yandex.ru

Received 30 June 2020; accepted 21 July 2020.

Abstract

Background. Despite the functional multiplicity and complexity of TNF- α effects, its role in the central nervous system in the development of various pathological conditions of the body is still poorly understood. **Objective.** Analyzing the dynamics of TNF- α and its receptors in the brain of urokinase (uPA-) gene-knockout mice with malignant growth in presence of chronic neurogenic pain (CNP). **Design and methods.** The study included male and female mice of two strains: C57BL/6 (n = 80) and C57BL/6-PlautmI.Bug-ThisPlau6FDhu/GFDhu (n = 56). A CNP model was created in animals of the main groups by the bilateral sciatic nerve ligation; 2 weeks after it, B16/F10 melanoma was transplanted under the skin of the back. The comparison group — sham operated animals with transplanted melanoma. Control groups — sham operated animals and animals with CNP. On day 21 of the melanoma growth, the mice were decapitated, and levels of TNF- α , sTNF- α R1 and sTNF- α R2 were determined in the cerebral tissues by ELISA. **Results.** High levels of TNF- α (by 5.6 times) and low TNF- α R1 (by 2.1 times) were registered in the brain of uPA- males, while no changes were registered in females. Under the influence of CNP, brain levels of TNF- α became similar in male and female mice; TNF- α levels in uPA- mice were twice higher than in animals with the normal genome. The CNP stimulating effect on the malignant process in uPA- mice was based: in females — on an increase in the cerebral concentration of TNF- α R2 (by 1.7 times, $p < 0.05$), in males — on TNF- α reduction (by 2.2 times). **Conclusion.** The specificity of the fibrinolytic status of mice determines the course of subcutaneously transplanted melanoma in presence of pain, and one of the mechanisms of this phenomenon involves a change in the functioning of the brain TNF- α system, depending on the animal gender.

Key words: brain, chronic pain, melanoma, mice, TNF- α , urokinase gene knockout.

For citation: Frantsiyants EM, Kaplieva IV, Bandovkina VA, et al. Influence of urokinase gene knockout on levels of TNF- α and its receptors in the brain of mice with experimental melanoma developing in presence of chronic neurogenic pain. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine*. 2020;7(4):74-82. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-4-74-82

Список сокращений: ХНБ — хроническая нейрогенная боль, TNF- α — фактор некроза опухоли α ; TNF- α R1 — рецептор 1 фактора некроза опухоли α , TNF- α R2 — рецептор 2 фактора некроза опухоли α , uPA — урокиназа.

Введение

Фактор некроза опухоли α (TNF- α), член суперсемейства TNF, является одним из наиболее важных провоспалительных цитокинов, который играет критическую роль во врожденных и адаптивных

иммунных реакциях организма, а также важен для поддержания гомеостаза на клеточном, тканевом и организменном уровнях [1].

TNF- α продуцируется в двух биоактивных формах: трансмембранной (tmTNF), которая действует путем межклеточного контакта и опосредует множество полезных действий TNF- α , и растворимой (solTNF), которая высвобождается после регулируемого расщепления tmTNF с помощью TNF- α -превращающего фермента (TACE/ADAM17) и обеспечивает системные воспалительные эффекты TNF- α . У мышей, дефицитных по TNF- α , как в solTNF, так и в tmTNF, нет нормальной структуры вторичных лимфоидных органов, и поэтому они не способны обеспечивать защитные реакции организма хозяина на инфекции [2].

TNF- α передает сигналы через два высокоаффинных рецептора на клеточной поверхности: рецептор 1 фактора некроза опухоли α (TNF- α R1) и рецептор 2 фактора некроза опухоли α (TNF- α R2). tmTNF эффективно передает сигналы через оба рецептора, тогда как solTNF избирательно передает сигналы через TNF- α R1, оставляя tmTNF в качестве основного лиганда TNF- α R2 [3]. TNF- α R1 экспрессируется повсеместно и участвует в очень сложных сигнальных путях. TNF- α R1 является членом семейства рецепторов смерти (DR), поскольку имеет внутриклеточную последовательность домена смерти и может индуцировать апоптоз в сенситизированных клетках путем рекрутирования FADD (Fas-ассоциированного белка домена смерти) и каспазы 8 в TRADD посредством гомотипических взаимодействий домена смерти. В отличие от широко экспрессируемого TNF- α R1, экспрессия TNF- α R2 ограничена иммунными клетками, эндотелиальными клетками и несколькими типами клеток центральной нервной системы. В то время как TNF- α R1 преимущественно способствует воспалительным сигнальным путям, TNF- α R2 опосредует иммуномодулирующие функции, содействует гомеостазу и регенерации тканей. Специфическая блокировка передачи сигналов TNF- α R1 либо путем прямого ингибирования TNF- α R1-селективными антагонистами, либо путем нацеливания на растворимый TNF- α , который преимущественно активирует TNF- α R1, может предотвращать неблагоприятные эффекты, связанные с общими ингибиторами TNF- α [4]. Избирательное ингибирование передачи сигналов рецептора TNF- α R1 потенциально может значительно снизить провоспалительную активность TNF- α , тем самым сохраняя полезные иммуномодулирующие сигналы, опосредованные TNF- α R2 [5].

Интенсивное междисциплинарное изучение биологических функций и терапевтического применения TNF- α выявило тонкие детали его функциональной множественности и сложности действий. Однако роль TNF- α в центральной нервной системе, особенно при развитии различных патологических состояний в организме, до сих пор понята не полностью.

Целью данного исследования явилось изучение динамики TNF- α и его рецепторов в головном мозге мышей с нокаутом по урокиназе при злокачественном росте на фоне хронической нейрогенной боли.

Материалы и методы

Работа выполнена на разнополых мышах двух линий. Мыши линии C57BL/6 ($n = 80$) получены из Научного центра биомедицинских технологий «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России; мыши линии C57BL/6-Plautm.I.Bug-This Plau6FDhu/GFDhu (C57BL/6-Plau) ($n = 56$), имеющие мутацию, приводящую к синтезу белка, неспособного связываться с урокиназой (uPAR), получены из питомника лабораторных животных «Пушино», филиала Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова. Возраст животных — 8 недель, масса — 21–22 г. Мыши содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животные каждой линии были распределены методом случайной выборки на группы: 1 контрольную группу — ложно оперированные мыши, 2 контрольную группу — мыши с воспроизведением модели хронической нейрогенной боли (ХНБ), группу сравнения — ложно оперированные мыши со стандартной перевивкой меланомы и основную группу — мыши, которым через 2 недели после воспроизведения модели ХНБ перевивали меланому.

В работе использовали клеточную линию мышиной меланомы B16/F10, полученную из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Перевивка опухоли представляла собой введение 0,5 мл взвеси клеток меланомы в физиологическом растворе (1:10) под кожу спины. При стандартной перевивке опухоль появляется в 100 % случаев, растет и метастазирует, основной сайт — легкие. Материал для перевивки мелано-

мы B16/F10 получали от мышей-доноров на 12–16 сутки развития опухоли. ХНБ создавали путем двустороннего лигирования седалищных нервов под ксила-золетилловым наркозом [6].

Животных декапитировали на 21 сутки от момента перевивки опухоли, так как нами установлено, что после этого срока погибает большинство экспериментальных животных с меланомой [7]. Головной мозг выделяли на льду. Из вещества мозга получали 10 % гомогенат, приготовленный на 0,1M калий-фосфатном буфере pH 7,4; с добавлением 0,1 % Твин-20 и 1 % БСА, в котором с помощью стандартных тест-систем методом иммуноферментного анализа определяли общий TNF- α — Bender Med Systems GmbH (Austria), а также sTNF- α R1 и sTNF- α R2 — R&D System (USA&Canada).

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 10.0. Все результаты были проверены на соответствие закону о нормальном распределении (критерий Шапиро–Уилка). Для показателей с нормальным распределением использовали критерий Стьюдента, для показателей, распределение которых не соответствовало нормальному, — критерий Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего арифметического значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты

Прежде всего, представляло интерес изучить количественные особенности TNF- α и его рецепторов в головном мозге мышей с нокаутом по урокиназе. Было установлено, что изменения затрагивали только генетически модифицированных самцов — у них в 5,6 раза увеличивалось церебральное содержание TNF- α и в 2,1 раза уменьшалось количество TNF- α R1 (табл. 1). По большей части сохранялась половая специфика, характерная для мозга мышей линии C57BL/6: у самок содержалось меньше TNF- α и больше TNF- α R2, чем у самцов. Однако если у генетически нормальных самок количество TNF- α было в 1,6 раза ($p < 0,05$) меньше, концентрация TNF- α R2 в 1,8 раза ($p < 0,05$) больше, чем у самцов, а уровень TNF- α R1 в головном мозге был одинаковым и у самцов, и у самок, то у самок линии C57BL/6-Plau церебральное содержание TNF- α было в 7,5 раза меньше, а концентрации TNF- α R1 и TNF- α R2 соответственно в 1,7 раза ($p < 0,05$) и в 1,5 раза ($p < 0,05$) больше, чем у самцов соответствующей линии (табл. 1).

ХНБ не влияла на церебральную концентрацию исследуемых показателей у мышей линии C57BL/6. Сохранялось половое соотношение уров-

ней рецепторов в мозге, присущее ложно оперированным животным: у самцов содержалось в 2,0 раза меньше TNF- α R2, количество TNF- α R1 было одинаковым у мышей обоего пола; при этом у самцов и самок уравнивались концентрации самого лиганда — TNF- α (табл. 1).

У мышей линии C57BL/6-Plau под влиянием ХНБ в 2,9 раза увеличивалось церебральное содержание TNF- α у самок и в 2,5 раза уменьшалось содержание TNF- α у самцов (табл. 1). В результате количество лиганда в мозге мышей, нокаутированных по урокиназе, становилось больше, чем у мышей линии C57BL/6: у самок — в 2,8 раза, у самцов — в 2,2 раза. Кроме того, как и у генетически нормальных мышей, стирались половые отличия по уровню TNF- α в головном мозге. Концентрация рецепторов в ткани мозга у самок несколько уменьшалась — становилась статистически значимо ниже, чем у ложно оперированных животных соответствующего пола с нормальным геномом: TNF- α R1 — в 1,5 раза ($p < 0,05$), TNF- α R2 — в 1,9 раза ($p < 0,05$). У самцов линии C57BL/6-Plau количество TNF- α R1 в мозге оставалось таким же низким, как у ложно оперированных животных этой же линии, а TNF- α R2 — не изменялось, что формировало приблизительно одинаковые церебральные концентрации обоих рецепторов и у самцов, и у самок с нокаутом по урокиназе на фоне ХНБ (табл. 1).

Далее мы проанализировали динамику исследуемых показателей в головном мозге у мышей обоих линий на фоне подкожного роста меланомы в изолированном варианте и на фоне ХНБ.

Было найдено, что у мышей линии C57BL/6 через 3 недели развития злокачественного процесса уровень TNF- α в мозге уменьшался и у самцов — в 2,3 раза, и у самок — в 1,5 раза ($p < 0,05$) относительно соответствующего показателя ложно оперированных мышей (табл. 1). Рост меланомы не изменял церебральную концентрацию TNF- α R1 у мышей обоего пола, но способствовал снижению в 2,4 раза TNF- α R2 у самок и увеличению в 1,8 раза TNF- α R2 у самцов, в результате у самок уровень этого рецептора становился в 2,5 раза меньше, чем у самцов (табл. 1).

У самок линии C57BL/6-Plau развитие злокачественного процесса в самостоятельном варианте не сопровождалось изменением уровня TNF- α в мозге, при этом содержание исследуемого фактора было в 2,2 раза больше, чем в аналогичной группе самок с нормальным геномом (табл. 1). У самцов мышей линии C57BL/6-Plau уровень TNF- α в мозге через 3 недели подкожного роста меланомы уменьшался в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с ложно оперированными самцами соответствующей ли-

Таблица 1. Динамика TNF- α и его рецепторов (пг/г тк) в головном мозге мышей

Группа	TNF- α		TNF- α R1		TNF- α R2	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Линия C57BL/6						
Ложно оперированные	179,2 $\pm$ 15,6	289,1 ^c $\pm$ 32,0	18,3 $\pm$ 1,5	17,2 $\pm$ 1,9	19,9 $\pm$ 2,2	11,3 ^c $\pm$ 1,1
ХНБ	229,4 $\pm$ 19,6	288,4 $\pm$ 26,5	17,9 $\pm$ 1,5	16,8 $\pm$ 0,9	16,7 $\pm$ 1,7	8,5 ^c $\pm$ 0,6
Меланома B16/F10	116,7* $\pm$ 9,1	128,3* $\pm$ 13,4	16,6 $\pm$ 1,2	15,4 $\pm$ 1,2	8,3* $\pm$ 0,6	20,9*, 1, c $\pm$ 2,3
Меланома B16/10 + ХНБ	125,2*, 1 $\pm$ 11,5	149,3*, 1 $\pm$ 15,2	12,4*, 1, 2 $\pm$ 1,2	11,6*, 1, 2 $\pm$ 1,1	9,5*, 1 $\pm$ 0,7	8,0 ² $\pm$ 0,8
Линия C57BL/6-PlautmI.Bug-This Plau6FDhu/GFDhu						
Ложно оперированные	217,9 $\pm$ 19,8	1631,7*, c $\pm$ 200,0	13,8 $\pm$ 2,1	8,1*, c $\pm$ 0,6	14,0 $\pm$ 1,5	9,2 ^c $\pm$ 1,0
ХНБ	639,2*, + $\pm$ 59,8	640,9*, + $\pm$ 65,2	12,6* $\pm$ 1,5	9,8* $\pm$ 0,8	10,4* $\pm$ 1,2	8,9 $\pm$ 0,9
Меланома B16/F10	258,8*, 2 $\pm$ 23,2	1007,7*, +, 1, 2, c $\pm$ 99,9	16,0 $\pm$ 1,7	13,7*, + $\pm$ 1,5	13,1*, 2 $\pm$ 1,2	10,5 ² $\pm$ 1,0
Меланома B16/10 + ХНБ	607,0*, +, 4 $\pm$ 62,4	460,7*, +, 1, 3, 4, c $\pm$ 45,2	16,1 $\pm$ 1,3	11,8* $\pm$ 1,0	17,5 ^{1, 3, 4} $\pm$ 1,5	8,3 ^c $\pm$ 0,8

Примечания: сносками в таблице обозначены статистически значимые отличия по сравнению: * — с показателями ложно оперированных животных линии C57BL/6; + — по сравнению с показателями ложно оперированных животных линии C57BL/6-Plau; ¹ — по сравнению с показателями животных с ХНБ соответствующей линии; ² — по сравнению с показателями ложно оперированных животных линии C57BL/6, носителей меланомы B16/F10; ³ — по сравнению с показателями ложно оперированных животных линии C57BL/6-Plau, носителей меланомы B16/F10; ⁴ — по сравнению с показателями животных линии C57BL/6, носителей меланомы B16/F10, с ХНБ; ^c — по сравнению с самками.

нии, но оставался в 7,9 раза выше, чем у самцов из аналогичной группы с нормальным геномом. В результате церебральное содержание TNF- α у самок с нокаутом по урокиназе оставалось меньшим, чем у самцов, разница составила 3,9 раза (табл. 1). Количество рецептора TNF- α R1 изменялось только у нокаутированных по урокиназе самцов — становилось в 1,7 раза ($p < 0,05$) больше по сравнению с ложно оперированными самцами и при этом значимо не отличалось от самок с ростом меланомы без ХНБ. Разницы с мышами линии C57BL/6 из аналогичной группы не было (табл. 1). Концентрация рецептора TNF- α R2 в мозге на фоне роста меланомы значимо

не изменялась ни у самцов, ни у самок, однако, как и в случае с другим рецептором, стиралось половое неравенство по этому показателю. В результате в головном мозге самок линии C57BL/6-Plau, носителей меланомы, содержалось в 1,6 раза больше TNF- α R2, а у самцов линии C57BL/6-Plau, носителей меланомы, в 2,0 раза меньше TNF- α R2, чем у генетически нормальных мышей соответствующего пола с опухолью (табл. 1).

Сочетание онкологического процесса с ХНБ у мышей линии C57BL/6 формировало такой же низкий, как и при изолированном росте меланомы, церебральный уровень TNF- α : содержание этого

фактора у самок было в 1,8 раза ($p < 0,05$), а у самцов — в 1,9 раза ($p < 0,05$) меньше, чем у животных соответствующего пола с ХНБ, и при этом статистически значимо не отличалось от мышей линии C57BL/6 с развитием меланомы без боли (табл.). Рост меланомы на фоне ХНБ у всех мышей линии C57BL/6 сопровождался еще большей редукцией TNF- α R1 — одинаковой и у самцов, и у самок: его количество в мозге становилось в 1,3 раза ($p < 0,05$) меньше по сравнению с ростом меланомы без боли и в 1,4 раза ($p < 0,05$) меньше по сравнению с ХНБ, что обеспечивало сохранение полового равенства по этому показателю (табл.). Содержание TNF- α R2 у самцов с ростом меланомы на фоне ХНБ было в 2,6 раза меньше, чем у самцов с изолированным ростом меланомы, и не отличалось от самцов, имеющих только ХНБ. Уровень TNF- α R2 у самок линии C57BL/6 уменьшался в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с мышами, имеющими только ХНБ, до низкого уровня самок с изолированным ростом меланомы. В результате уровни TNF- α R2 в головном мозге у самцов и самок мышей линии C57BL/6 с меланомой, растущей на фоне ХНБ, не отличались друг от друга (табл.).

У самок мышей линии C57BL/6-Plau с меланомой, растущей на фоне ХНБ, количество TNF- α в мозге не отличалось от мышей с изолированной ХНБ и, следовательно, было большим, чем у ложно оперированных самок соответствующей линии — в 2,8 раза, и большим по сравнению с изолированным ростом меланомы у самок линии C57BL/6 — в 4,8 раза и линии C57BL/6-Plau — в 2,3 раза (табл.). Кроме того, в ткани мозга нокаутированных самок увеличивалась концентрация TNF- α R2 — она становилась больше по сравнению с самками соответствующей линии с изолированными патологическими процессами: ХНБ — в 1,7 раза ($p < 0,05$) и ростом меланомы — в 1,3 раза ($p < 0,05$), а также по сравнению с аналогичной группой самок линии C57BL/6 — в 1,8 раза ($p < 0,05$). Количество TNF- α R1 не изменялось (табл.).

У самцов мышей линии C57BL/6-Plau с меланомой, растущей на фоне ХНБ, количество TNF- α в мозге становилось меньше, чем у ложно оперированных самцов соответствующей линии — в 3,5 раза, самцов с ХНБ — в 1,4 раза ($p < 0,05$), самцов-носителей меланомы B16, развивающейся без боли, — в 2,2 раза и самок из аналогичной группы — в 1,5 раза ($p < 0,05$), но по-прежнему оставалось больше, чем у самцов линии C57BL/6 — в 3,1 раза (табл.). Развитие подкожно перевитой меланомы на фоне ХНБ у самцов линии C57BL/6-Plau, в отличие от самок, не сопровождалось изменением церебральных уровней TNF- α R1 и TNF- α

R2, в результате содержание TNF- α R2 в их мозге было в 2,1 раза меньше, чем у самок этой же линии и группы (табл.).

Обсуждение

1. Нокаут по урокиназе. Установлено, что генетический дефект урокиназы, не позволяющий ей связываться со своим рецептором, приводит к значительному нарастанию концентрации TNF- α и уменьшению уровня TNF- α R1 исключительно в головном мозге у самцов мышей и не влияет на уровень лиганда и рецепторов TNF- α у самок. Связь между фибринолитической системой мозга и TNF- α была установлена ранее. Так, использование псилоцибина — серотонинергического психоделика приводило к снижению активности PAI-1 через понижение уровня TNF- α и способствовало раствориванию tPA, увеличению продукции mBDNF и нормализации синаптической пластичности [8]. Накопление TNF- α в мозге у самцов линии C57BL/6-Plau — неблагоприятный признак, поскольку известно, что TNF- α является одним из ключевых игроков в развитии инсульта и может нарушать работу мозга [9]. Такая половая церебральная специфика TNF- α у самцов с нокаутом по урокиназе может быть обусловлена низким уровнем эстрогенов в их организме: доказана связь повышенной экспрессии TNF- α и дефицита эстрогенов [10]. Тогда как у самок линии C57BL/6-Plau эстрогены в условиях измененного функционирования системы урокиназы, по всей видимости, стабилизировали церебральный уровень TNF- α и его рецепторов. Регуляторная роль пути эстрадиол / α -рецептор эстрогенов в отношении состава и активности внеклеточной протеолитической молекулярной сети была выявлена Bouris P. et al. (2015) [11]. Найдено, что подавление рецептора эстрогенов сильно влияет на экспрессию генов и белков различных эффекторов внеклеточного матрикса, включая компоненты системы активации плазминогена: uPA, tPA и PAI-1. Низкий уровень TNF- α R1 у самцов, вероятно, развивался компенсаторно с целью ограничения неблагоприятных эффектов TNF- α . Известно, что у мышей TNF R1-/R2- не происходит увеличения экспрессии провоспалительных факторов в мозге при системном введении TNF- α .

2. ХНБ. Установлено, что TNF- α и фибринолитическая система участвуют в патогенезе хронической нейрогенной боли [10, 12]. Так, на 7–10 сутки после перерезки двух из трех концевых ветвей седалищного нерва (большеберцового и малоберцового нервов) регистрируется перепроизводство TNF- α и активация микроглии в спинном мозге и гипоталамусе через TNF- α R1 [12]. В нашем эксперименте

через 2 недели после двустороннего лигирования седалищных нервов церебральный уровень TNF- α у генетически нормальных мышей не изменялся, тогда как у самок с нокаутом по урокиназе он увеличивался, а у самцов этой же линии — снижался относительно высокого показателя ложно оперированных мышей, но оставался выше, чем у мышей с нормальным геномом. Обращает на себя внимание половое выравнивание церебральных концентраций TNF- α под влиянием ХНБ у мышей обеих линий, при этом в несколько раз больший уровень TNF- α у мышей линии C57BL/6-Plau может свидетельствовать о развитии или предрасположенности к развитию воспалительной реакции в мозге [10].

3. Меланома B16/F10. TNF- α , наряду с интерлейкинами: 1 β , 6, 8 и γ -интерфероном, относится к основным системным и опухолевым воспалительным цитокинам, концентрация которых возрастает в плазме при онкологической патологии [13]. Однако развитие злокачественного процесса у мышей с нормальным геномом и у самцов с нокаутом по урокиназе сопровождалось уменьшением церебрального пула TNF- α , тогда как у самок линии C57BL/6-Plau уровень этого фактора в головном мозге не изменялся. Двукратная редукция TNF- α в мозге у генетически нормальных мышей со злокачественным процессом может являться одним из возможных механизмов формирования «cancer induced depression». Установлено, что TNF- α необходим для поддержания синаптического скейлинга и, таким образом, влияет на обучение и формирование памяти, а также играет роль в модулировании патологических состояний тревоги и депрессии [14]. Кроме того, была выявлена разнонаправленная зависящая от пола динамика TNF- α R2 в мозге мышей линии C57BL/6 на фоне роста подкожно перевитой меланомы: у самок — уменьшение концентрации, у самцов — увеличение. Вероятно, у самцов с нормальным геномом, которые жили меньше, но имели в 2,0 раза больший объем подкожного опухолевого узла, чем самки [7], увеличение экспрессии TNF- α R2 в мозге на фоне более интенсивного злокачественного роста сопряжено с активацией сигналов про-выживания нейронов за счет прямого рекрутирования TRAF2 и последующей активацией путей PKB/Akt и NF- κ B [2].

У мышей линии C57BL/6-Plau содержание TNF- α в головном мозге на фоне роста меланомы было в несколько раз выше, чем у мышей линии C57BL/6, особенно — у самцов, что связано, на наш взгляд, с особенностями гормональной регуляции при измененном функционировании фибринолитической системы. У самок с генетическим дефектом урокиназы эстрогены не только

стабилизировали исходный церебральный уровень TNF- α , но и предупреждали развитие его дефицита в условиях формирования подкожной меланомы. Большие уровни TNF- α в мозге у мышей линии C57BL/6-Plau через 3 недели развития опухолей сочетались с меньшими объемами подкожных опухолевых узлов меланомы: у самцов — в 2,8 раза, у самок — в 69,0 раз по сравнению с генетически нормальными мышами соответствующего пола [7]. При этом сохранение фоновых церебральных значений TNF- α , TNF- α R1 и TNF- α R2 у самок соответствовало максимальному подавлению опухолевого роста и отсутствию кровоизлияний в легких и сердце, характерных для самцов этой линии [7].

4. ХНБ и меланома B16/F10. Совокупность пониженной церебральной концентрации TNF- α , приущей развитию меланомы в самостоятельном варианте, и низкого уровня TNF- α R1 в мозге мышей линии C57BL/6, носителей меланомы, формирующаяся на фоне ХНБ, свидетельствовала об усугублении нарушенной работы центральной нервной системы при сочетанном действии на организм двух патологических факторов. Такие особенности функционирования системы TNF- α в мозге способствовали увеличению злокачественного потенциала опухоли с ростом числа и сайтов метастазирования и уменьшению продолжительности жизни экспериментальных животных [7]. Известно, что уменьшение физического присутствия TNF- α R1 в клетке лимитирует основной TNF-опосредованный путь ее гибели, подвергая нерегулируемому некрозу (некроптозу) другими рецепторами смерти [2]. Физическое присутствие TNF- α R1 необходимо для нейропротекции и выживания животных.

У мышей линии C57BL/6-Plau под влиянием ХНБ также возрастал злокачественный потенциал меланомы, но иначе, чем у мышей линии C57BL/6: увеличивалась скорость роста опухолевого узла — его объем двукратно превышал размеры опухолей мышей с нормальным геномом из аналогичной группы; и усиливалось метастазирование: у самок — увеличивалось количество метастазов в легких, у самцов — впервые под влиянием боли появлялись метастазы в легких и печени [7].

Своеобразной картине онкогенеза перевитой меланомы у мышей линии C57BL/6-Plau под действием ХНБ соответствовала иная динамика компонентов системы TNF- α в мозге. У самок количество лиганда оставалось таким же большим, как и при изолированной ХНБ, но возрастал церебральный уровень TNF- α R2, у самцов — содержание TNF- α становилось даже меньше, чем при изолированной боли, при этом уровень рецепторов в мозге не изменялся. По всей видимости, умерен-

но высокая концентрация TNF- α в мозге и у самцов, и у самок линии C57BL/6-Plau обеспечивала иное течение злокачественного процесса на фоне хронической боли, при этом рост церебрального уровня TNF- α R2 у самок, на наш взгляд, был связан с усугубляющимся повреждением легких: увеличением количества метастатических очагов и появлением кровоизлияний в них [7].

Заключение

Таким образом, связанные с полом количественные особенности компонентов системы TNF- α в мозге у мышей с нокаутом по урокиназе с большой долей вероятности свидетельствуют о защитной роли эстрогенов в условиях измененного функционирования фибринолитической системы, что приводит к стабилизации церебральной системы TNF- α и тем самым способствует выраженному торможению злокачественного процесса у самок. ХНБ стирает половые отличия содержания TNF- α в мозге мышей, при этом у животных с нокаутом по урокиназе в мозге экспрессируется большее количество этого фактора. Основу стимулирующего действия ХНБ на злокачественный процесс у мышей-носителей меланомы с нокаутом по урокиназе составляют: у самок — увеличение церебральной концентрации TNF- α R2, у самцов — редукция TNF- α .

Следовательно, специфика фибринолитического статуса мышей определяет течение злокачественного процесса подкожно перевитой меланомы на фоне боли, один из механизмов этого явления — изменение функционирования системы TNF- α головного мозга, зависящее от пола животного.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2 Suppl 2): S53–72.
2. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015; 302: 2–22.
3. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhout S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(2): 135–147.
4. Fischer R, Kontermann RE, Maier O. Targeting sTNF/TNFR1 signaling as a new therapeutic strategy. *Antibodies*. 2015; 4: 48–70.
5. Steeland S, Puimege L, Vandenbroocke RE, et al. Generation and characterization of small single domain antibodies inhibiting human tumor necrosis factor receptor

1. *J Biol Chem*. 2015; 290(7): 4022–4037.

6. Kit OI, Frantsiyants EM, Kotieva IM, et al. Dynamics of the tissue system of plasminogen regulators in cutaneous melanoma with chronic pain in female mice. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine*. 2018; 5(2): 38–46. In Russian [Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Динамика тканевой системы регуляторов плазминогена при меланоме кожи на фоне хронической боли у самок мышей. *Трансляционная медицина*. 2018; 5(2): 38–46].

7. Frantsiyants EM, Kaplieva IV, Surikova EI et al. Effect of urokinase gene-knockout on growth of melanoma in experiment. *Sibirskiy Nauchnyy Meditsinskiy Zhurnal=Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39(4): 62–70. In Russian [Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Сурикова Е.И. и др. Влияние нокаута по гену урокиназы на рост меланомы в эксперименте. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39(4): 62–70].

8. Idell RD, Florova G, Komissarov AA, et al. The fibrinolytic system: A new target for treatment of depression with psychedelics. *Med Hypotheses*. 2017; 100: 46–53.

9. Liguz-Lecznar M, Zakrzewska R, Kossut M. Inhibition of Tnf- α R1 signaling can rescue functional cortical plasticity impaired in early post-stroke period. *Neurobiol Aging*. 2015; 36(10): 2877–2884.

10. Chen BL, Li YQ, Xie DH, et al. Blocking TNF- α with infliximab alleviates ovariectomy induced mechanical and thermal hyperalgesia in rats. *Neurol Sci*. 2012; 33(3): 527–533.

11. Bouris P, Skandalis SS, Piperigkou Z, et al. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biol*. 2015; 43: 42–60.

12. Liu Y, Zhou L-J, Wang J, et al. TNF- α differentially regulates synaptic plasticity in the hippocampus and spinal cord by microglia-dependent mechanisms after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2017; 37(4): 871–881.

13. Buoncervello M, Maccari S, Ascione B, et al. Inflammatory cytokines associated with cancer growth induce mitochondria and cytoskeleton alterations in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2019; 234(11): 20453–20468.

14. Camara ML, Corrigan F, Jaehne EJ, et al. TNF- α and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38(12): 3102–3114.

Информация об авторах:

Франциянц Елена Михайловна, д.б.н., профессор, заместитель генерального директора по науке, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Каплиева Ирина Викторовна, д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Бандовкина Валерия Ахтямовна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Сурикова Екатерина Игоревна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Нескубина Ирина Валерьевна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Трепитаки Лидия Константиновна, лаборант исследователь лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Лесовая Наталья Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России;

Author information:

Frantsiyants Elena M., Dr. Sci., Professor, Deputy General Director for Science, National Medical Research Centre for Oncology;

Kaplieva Irina V., Dr. Sci., Senior Researcher, Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology;

Bandovkina Valeria A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology;

Surikova Ekaterina I., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology;

Cheryarina Natalia D., Laboratory Doctor, Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology;

Neskubina Irina V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology;

Trepitaki Lidia K., Laboratory Assistant, Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology;

Lesovaya Natalia S., Junior Researcher, Laboratory of Study of Malignant Tumor Pathogenesis, National Medical Research Centre for Oncology.